

Fractionation of Di- and Trinucleotides Obtained from Ribonuclease Digests and Their Optical Rotatory Dispersion Studies (リボヌク レアーゼ消化で得られるジーおよびトリヌクレオチ ドの分離とそれらの旋光分散)

著者	青柳 象平
号	155
発行年	1968
URL	http://hdl.handle.net/10097/23320

氏名・（本籍）	あお 青 やぎ 柳 しやう 象 へい 平
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 1 5 5 号
学位授与年月日	昭和 4 3 年 3 月 2 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学専攻
学 位 論 文 題 目	Fractionation of Di--and Trinucleotides Obtained from Ribonuclease Digests and Their Optical Rot- atory Dispersion Studies （リボヌクレアーゼ消化で得られるジーおよび トリヌクレオチドの分離とそれらの旋光分散） （主査）
論 文 審 査 委 員	教 授 中 西 香 爾 教 授 瀬 戸 秀 一 教 授 田 宮 信 雄

論 文 目 次

第一章	緒 論
第二章	分 離 法
2・1	リボヌクレアーゼ T ₁ 消化により得られるジーおよびトリヌクレオチド
2・2	降膜リボヌクレアーゼ消化により得られるジーおよびトリヌクレオチド
第三章	紫外吸収スペクトルと淡色効果
第四章	ジヌクレオチドの旋光分散
第五章	トリヌクレオチドの旋光分散
第六章	ジヌクレオチドの旋光分散に基づく計算法
第七章	ジヌクレオチドの核磁気共鳴スペクトル

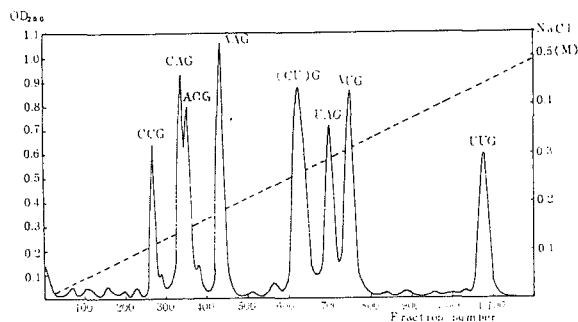
論文内容要旨

第1章 緒 論

核酸の高次構造の詳しい知識を得る事は核酸の機能を理解する上からも重要である。そのため、現在までに、種々のモデルを使った多くの研究が行われて来ている。一方、よく研究の行われている最小構成要素であるモノヌクレオチドの物性は、ポリヌクレオチドの場合と質的にも非常に異なり、これを核酸の物性と関連づける事は困難である。そこで、両者の性質の隔たりを連絡する意味からも、モデル物質としてのオリゴヌクレオチドが重視されるが、それに関する知識が最も不足していた。また、核酸の基本的な生物活性が現われはじめるのもオリゴヌクレオチドからであり、その点でも興味ある物質である。そこで、まず、リボ核酸のヌクレアーゼ消化により生ずるジーおよびトリヌクレオチドのイオン交換クロマトグラフィーによる分離を検討し、よい結果を得た。物性研究の方法には種々あるが、主としてORDによる研究を行った。

第2章 分離法

2・1 リボヌクレアーゼ T_1 消化で生ずるジーおよびトリヌクレオチドのカラムクロマトグラフィーによる分離は、ほとんど開発されていなかったが、Tomlinson-TenerのカラムとDowex 1- \times 2樹脂によるカラムクロマトグラフィーを組合せる事により、よい結果を得た。すなわち、まず、最初のカラムで重合度による分別を行い、そのジーおよびトリヌクレオチド分画をそれぞれ、Dowex 1- \times 2カラムにより酸性条件下、食塩の直線濃度勾配をかけて溶離した。



第1図 リボヌクレアーゼ T_1 消化で生ずるトリヌクレオチドの溶離曲線

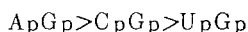
この方法で3種のジヌクレオチドおよび9種のトリヌクレオチドのうち、7種の分離に成功した。これらのヌクレオチドは、パーパークロマトグラフィーおよび、塩基組成分析により高純度であった。トリヌクレオチドのうち、2種の配列異性体、 $C_pU_pG_p$ と $U_pC_pG_p$ の分離にはまだ成功していない。

2・2 膵臓リボヌクレアーゼ消化で生ずるジおよびトリヌクレオチドの分離は、これまでDEAEセルロースカラムを使って広く行われているが、前述の方法を採用して、よりよい結果が得られた。これは特に、多量の試料を調製する目的に適している。これまでカラムによる分離が行われていなかった配列異性体、 ApGpCp と GpApCp は、ギ酸型DEAEセルロースカラで分離出来た。

第3章 紫外吸収スペクトルと淡色効果

核酸の機能の特異性は第一に、そのヌクレオチド配列に依存している。また、最近特に、転移RNAのヌクレオチド配列の決定が盛んになり、酵素消化で得られるオリゴヌクレオチドの簡単な同定および定量法が望まれる。そこで、リボヌクレアーゼ T_1 消化で得られたジおよびトリヌクレオチドのpH1, 7および13における紫外吸収スペクトルを測定し、同定、定量に有用な標準的諸定数を算出した。ほとんどのジおよびトリヌクレオチドが、配列異性体、 ApCpGp と CpApGp をも含めて紫外吸収スペクトルから区別可能であり、他の配列異性体、 ApUpGp と UpApGp も淡色効果を考慮すれば区別可能である。

淡色効果は、ヌクレオチド塩基間相互作用によるもので、これからヌクレオチドのコンホーメーションに関する知見が得られる。淡色効果から見た塩基間相互作用の強さは、

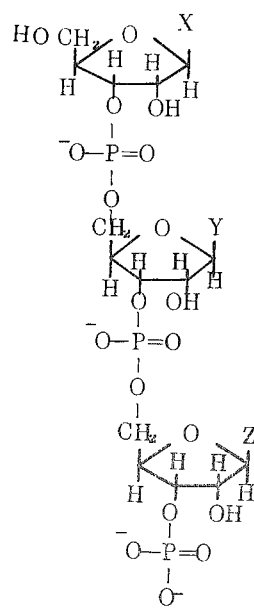


$\text{ApApGp} > \text{ApCpGp}$, $\text{CpApGp} > \text{UpApGp} > \text{CpCpGp} > \text{ApUpGp} > \text{UpUpGp}$ である。

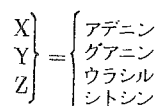
第4章 ジヌクレオチドの旋光分散

ジヌクレオチドのコンホーメーションを検討する事および、末端のリン酸基の効果を調べる目的で、リボヌクレアーゼ T_1 および膵臓リボヌクレアーゼ消化により得られる7種のジヌクレオチドと各々に対応するデヌクレオシドリン酸のORDを測定した。

各ヌクレオチドは塩基組成および配列により特徴的な異常分散（正のコットン効果）を示す。こ



トリヌクレオチド
 $X_p Y_p Z_p$



れは、塩基間相互作用が各ヌクレオチドで異なるためである。相互作用の尺度として、構成要素の旋光度の和との差、 $[\![M]_{xpy} - ([M]_{px} + [M]_{py})\!]_{\max}$ を比較すると、塩基間相互作用（塩基間重なり効果）の順序は、

$$ApCp > ApUp > ApGp > CpGp > UpGp > GpUp > GpCp$$

であった。

また、各ジヌクレオチドに対応するジヌクレオシドリッ酸と比較すると、コットン効果の振巾と $[\![M]_{xpy} - ([M]_{px} + [M]_{py})\!]_{\max}$ の両方において後者が大きな値を示す。また、 $[\![M]_{xpy} - ([M]_{px} + [M]_{py})\!]_{\max}$ 値と淡色効果の両方が $ApGp > CpGp > UpGp$ であるのに、ジヌクレオシドリッ酸では、 $ApG > UpG > CpG$ である。以上から末端のリン酸基は、ジヌクレオチドのコンホーメーションに可成りの影響を与えている事が結論される。

第5章 トリヌクレオチドの旋光分散

リボヌクレアーゼ T_1 消化により得られる7種のトリヌクレオチドと、豚臓リボヌクレアーゼ消化からの2組の配列異性体、 $ApGpCp - GpApCp$ と $ApGpUp - GpApUp$ のORDを測定した。この結果から、ORDによれば配列異性体であっても、明確な同定が可能である。

ORDスペクトルをpHを変化させて（pH 1, 7, および 11）測定した結果、塩基の解離状態と、コンホーメーションとの関連が明かとなった。例えば、 $ApApGp$ はpH 1では、プロトン付加したアデノシン残基（ $pK=3.7$ ）間の反発により塩基間重なり効果が減少し、ランダムな構造をとる。このため、コットン効果の振巾は激減する。 $UpUpGp$ の場合、ウリジン残基（ $pK \approx 0.5$ ）に対するプロトン付加が起り難いのでpH 7の場合と大差ないORD曲線を示す。

ジヌクレオチドの場合と同じ方法でコンホーメーションを分類して次の結果を得た。

	pH 1	pH 7	pH 11
$ApApGp$	U	S	S
$ApCpGp$	U	S	S
$ApUpGp$	U	U	U
$CpApGp$	U	S	S
$CpCpGp$	$\frac{1}{2}S$	S	S
$UpApGp$	U	S	U
$UpUpGp$	U	U	U

(S) : 塩基間重なり構造

($\frac{1}{2}S$) : 中間的構造

(U) : ランダム構造

これから、プロトン解離基が分子中に1個以下のものは、pH 11でも(S)であり、2個以上のものはランダムな構造をとると云える。

第6章 ジヌクレオチドの旋光分散に基づく計算法

Tinoco らは、ジヌクレオシドリソ酸の旋光度から、トリヌクレオシドリソ酸の旋光度を計算する式

$$[\phi]_{xpxpz} = \frac{1}{3}(2[\phi]_{xpy} + 2[\phi]_{ypz} - [\phi]_y) \quad (1)$$

を提出し、さらに、ポリヌクレオチドの場合にも拡張できるとしている。しかし、計算値は必ずしも、実測値と良い一致を示していない。オリゴヌクレオチドにおいて、重合度が増加するにつれて塩基/リン酸比： (B/p) は1に近づくから、最隣接塩基の単位としてジヌクレオチド $(B/p=1)$ を採るべきである。ジヌクレオシドリソ酸 $(B/p=2)$ の旋光性は実際、四章で述べた様にジヌクレオチドと異っている。そこで、

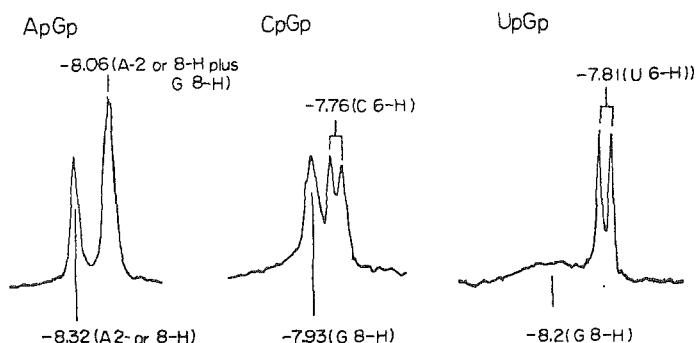
$$[\phi]_{xpypzp} = \frac{1}{3}(2[\phi]_{xpy} + 2[\phi]_{ypzp} - [\phi]_y) \quad (2)$$

として、 $ApUpGp$ 、 $ApCpGp$ 、 $ApGpCp$ および $ApGpUp$ のORD曲線を計算し(1)式によるものと比較した結果、(2)式の方が実測に近い値を示した。さらに、 $ApUpGp$ の計算結果では、最隣接塩基間のみならず、1, 3 塩基間の相互作用も考慮すべきであると思われる。

第7章 ジヌクレオチドの核磁気共鳴スペクトル

ORD スペクトルや淡色効果から得られる知見は分子全体に関するものであるが、NMR スペクトルからは分子の局所的な状態に関する知見が得られる。

$ApGp$ 、 $CpGp$ および $UpGp$ のNMR (100Mc) スペクトルを D_2O 中で測定し、その塩基部分のプロトンシグナルを比較すると、5'-末端側の塩基のシグナルの線巾は、 $ApGp > CpGp > UpGp$ の順となる。一方、グアニンの H_8 プロトンの線巾は $\Delta\nu_{\frac{1}{2}} \doteq 54cps$ に達する。



これ等の現象の説明として、5'-末端側の塩基に関しては、 $ApGp$ では、強い塩基間重なり効果のため、グリコシド結合を軸とする塩基の回転がほとんど阻止されているのに対し、塩基間重なり効果の小さい $UpGp$ では、ウラシルの自由回転が可能のためと考えられる。グアニンの H_8 プロト

ンに関しては、塩基間重なり効果が減少すると、静止していたグアニンの回転が束縛された状態で
〃適度に〃可能となり、その結果、線巾は非常に増大すると考えられる。

このような現象は、 $-U_p G_p U_p-$ なる配列は、それがたとえRNAのループ部分に存在しても、シ
グナルの線巾増加に寄与している事を示すものと思われる。

論文審査結果の要旨

本学位論文はリボ核酸の酵素分解で生ずるジーおよびトリヌクレオチドの分離法とそれらのコンホメーションについて検討を加えたもので七章からなる。

第一章はオリゴヌクレオチドが核酸の高次構造研究のためのモデルとして非常に適切な物質であること、またその研究手段としての施光分散と核磁気共鳴スペクトル法の有効性について論じている。

第二章はジーおよびトリヌクレオチドの二段階でのイオン交換クロマトグラフィーによる分離法で二節よりなる。第一節はリボヌクレアーゼ T_1 消化物に関するもので三種のジヌクレオチドとトリヌクレオチド九種中七種の分離に初めて成功している。第二節は膵臓リボヌクレアーゼ消化物に関するもので特に多量調製の目的には従来の方法よりはるかに良い結果を得た。この様なオリゴヌクレオチドの多量調整法の確立は核酸研究へ寄与するところが大きいと考えられる。

第三章はリボヌクレアーゼ T_1 で得られるジーおよびトリヌクレオチドの同定、定量への紫外吸収スペクトル資料の応用を論じており、その簡便性が指摘された。

第四章では七種のジヌクレオチドの施光分散を測定し、一次構造および塩基間相互作用を評価した。また3'-末端の磷酸基がコンホメーションに大きな影響を与えることを初めて明かにしている。

第五章ではトリヌクレオチドに対し、同様な考察をし、施光分散に対する塩基配列の影響を八種類の配列異性体の例で示し、またコンホメーションに及ぼすpHの影響を調べ種々のpHでの塩基間相互作用の大きさを評価して三群に分類した。

第六章ではトリヌクレオチドの施光性を構成単位である最隣接塩基組のそれから計算している。最隣接塩基組にジヌクレオシド磷酸よりもジヌクレオチドを用いた方が実測値に良い一致が得られる事は興味を持たれる。また、塩基間重なり作用がヌクレオチド鎖中間で害される場合、1.3相互作用が考慮されるべきことを見出した。

第七章では七種のジヌクレオチドの核磁気共鳴スペクトルを測定し、グアニル酸を含む塩基間相互作用の弱いヌクレオチドではグアニンのグリコシド結合を軸とする回転が著しく抑えられている事が吸収線の線中を測定する事により明らかとなった。この現象は核酸の核磁気共鳴スペクトルを解釈する上で重要な新事実である。

以上の結果により、当初の目的は達せられた。よって青柳象平提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。